

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
**Image Problem Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 17 May 2001 (17.05.01)
Applicant's or agent's file reference 20054P WO
International application No. PCT/EP00/07601

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.  
Kopernikusstrasse 9  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

28. MAI 2001

Weickmann  
Postfach 10 00 07 601

**IMPORTANT NOTIFICATION**

International filing date (day/month/year)  
04 August 2000 (04.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant     the inventor     the agent     the common representative

Name and Address HEPAVEC AG FÜR GENTHERAPIE Robert-Rössle-Strasse 10 D-13125 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person     the name     the address     the nationality     the residence

Name and Address DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT FÜR ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE FORSCHUNG Rudolf-Wissell-Strasse 28 37079 Göttingen Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

the receiving Office  
 the International Searching Authority  
 the International Preliminary Examining Authority

the designated Offices concerned  
 the elected Offices concerned  
 other:

The International Bur au of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer N. Wagner Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWEISSENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>20054P WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/ 07601</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>04/08/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>06/08/1999</b>
Anmelder <b>HEPAVEC AG FÜR GENTHERAPIE et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**NICHT-HUMANER ADENOVIRALER VEKTOR FÜR DEN GENTRANSFER, SEINE ANWENDUNG UND SEINE HERSTELLUNG**

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl der Anspruch 7 und die Ansprüche 6,12-14,16 und 17 soweit sie sich auf eine Anwendung *in vivo* beziehen, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 00/07601

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12N15/861 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 06826 A (BOTH GERALD WAYNE ;COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 27. Februar 1997 (1997-02-27) das ganze Dokument ---	1-17
X	HOFMANN C. ET AL.: "Ovine adenovirus vectors overcome preexisting humoral immunity against human adenoviruses in vivo." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 73, Nr. 8, 20. Juli 1999 (1999-07-20), Seiten 6930-6936, XP002153161 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument ---	1-13, 15-17 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

17. November 2000

30/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 00/07601

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 820 868 A (PREVEC LUDVIK ET AL) 13. Oktober 1998 (1998-10-13)  Spalte 28, Zeile 20 – Zeile 44 ---	1-4, 6-13, 15-17
X	FR 2 763 959 A (TRANSGENE SA) 4. Dezember 1998 (1998-12-04) Seite 1, Zeile 26 –Seite 2, Zeile 2 Seite 5, Zeile 30 –Seite 6, Zeile 12 Seite 12, Zeile 25 –Seite 13, Zeile 15 ---	1-4, 6-17
A	CHEN H.-H. ET AL.: "DNA FROM BOTH HIGH-CAPACITY AND FIRST-GENERATION ADENOVIRAL VECTORS REMAINS INTACT IN SKELETAL MUSCLE" HUMAN GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 3, Februar 1999 (1999-02), Seiten 365-373, XP000891934 ISSN: 1043-0342 das ganze Dokument ---	14-16
P, X	EP 1 001 030 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 17. Mai 2000 (2000-05-17) Seite 2, Zeile 18 – Zeile 24 Beispiel 7 -----	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

EP 00/07601

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9706826	A 27-02-1997	AU 708870 B AU 6696696 A CA 2229631 A EP 0851769 A JP 11511139 T NZ 315295 A US 6020172 A		12-08-1999 12-03-1997 27-02-1997 08-07-1998 28-09-1999 29-09-1999 01-02-2000
US 5820868	A 13-10-1998	AU 1189195 A WO 9516048 A EP 0736100 A US 6086890 A US 6001591 A		27-06-1995 15-06-1995 09-10-1996 11-07-2000 14-12-1999
FR 2763959	A 04-12-1998	AU 8024798 A EP 0988391 A WO 9855639 A		21-12-1998 29-03-2000 10-12-1998
EP 1001030	A 17-05-2000	AU 6083299 A WO 0017373 A		10-04-2000 30-03-2000

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

10/049.301

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 20054P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/07601	International filing date (day/month/year) 04 August 2000 (04.08.00)	Priority date (day/month/year) 06 August 1999 (06.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/861, A61K 48/00		
Applicant DEVELOGEN AKTIENGESELLSCHAFT FÜR ENTWICKLUNGSBIOLOGISCHE FORSCHUNG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 February 2001 (07.02.01)	Date of completion of this report 24 January 2002 (24.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/07601

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

 the international application as originally filed the description:

pages \_\_\_\_\_ 1-16 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the claims:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19)

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages 1-10 \_\_\_\_\_, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001)

 the drawings:

pages 1/3-3/3 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP00/07601

**IV. Lack of unity of invention****1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:**

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2.  This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/EP 00/07601**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 9	YES
	Claims	10	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 10	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****See the Supplemental Box.**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

This report makes reference to the following international search report documents:

- D1:** WO-A-97/06826 (BOTH GERALD WAYNE; COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 27 February 1997 (1997-02-27)
- D2:** HOFMANN C. ET AL.: 'Ovine adenovirus vectors overcome preexisting humoral immunity against human adenoviruses *in vivo*', JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 73, No. 8, 20 July 1999 (1999-07-20), pages 6930 - 6936, ISSN: 0022-538X
- D3:** US-A-5 820 868 (PREVEC LUDVIK ET AL) 13 October 1998 (1998-10-13)
- D4:** FR-A-2 763 959 (TRANSGENE SA) 4 December 1998 (1998-12-04)
- D5:** CHEN H.-H. ET AL.: 'DNA FROM BOTH HIGH-CAPACITY AND FIRST-GENERATION ADENOVIRAL VECTORS REMAINS INTACT IN SKELETAL MUSCLE', HUMAN GENE THERAPY, Vol. 10, No. 3, February 1999 (1999-02), pages 365 - 373, ISSN: 1043 - 0342
- D6:** EP-A-1 001 030 (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 17 May 2000 (2000-05-17).

The following documents are also taken into consideration:

- D7:** XU ZZ, HYATT A, BOYLE DB, BOTH GW: 'Construction of ovine adenovirus recombinants by gene insertion or deletion of related terminal region sequences', VIROLOGY, 31 March 1997, Vol. 230, No. 1, pages 62 - 71
- D8:** ROTHÉL JS, BOYLE DB, BOTH GW, PYE AD, WATERKEYN JG, WOOD PR, LIGHTOWLERS MW: 'SEQUENTIAL NUCLEIC ACID AND RECOMBINANT ADENOVIRUS VACCINATION INDUCES HOST-PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES AGAINST *TAENIA OVIS*

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

INFECTION IN SHEEP', PARASITE IMMUNOLOGY, May 1997,  
Vol. 19, pages 221 - 227

**D9:** KLONJKOWSKI B, GILARDI-HEBENSTREIT P, HADCHOUEL J,  
RANDRIANARISON V, BOUTIN S, YEH P, PERRICAUDET M,  
KREMER EJ: 'A recombinant E1-deleted canine adenoviral  
vector capable of transduction and expression of a  
transgene in human-derived cells and *in vivo*', HUMAN  
GENE THERAPY, 20 November 1997, Vol. 8, No. 17,  
pages 2103 - 2115

**D10:** WO-A-96/03508, mentioned in D1.

**Box IV** (Lack of unity of invention)

The present application lacks unity within the meaning of PCT Rule 13.1. The reasons are as follows:

1. The single common concept linking independent Claims 1 and 10 is the use of a non-human adenovirus vector to produce an agent for the transfer of genetic material. Such uses are already known, however, from **D1, D2, D3, D7, D8** and **D9**, and therefore a common inventive concept does not exist.
2. Furthermore, the concept common to the intended applications in independent Claim 1 is the use of a non-human adenovirus vector to produce an agent for the transfer of genetic material by local injection, namely injection into "muscle cells of mammals which present modified symptoms, which may be pathological, or tumours". Since intramuscular administration of OAV287 in sheep for immunization purposes is known

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

from **D8**, this concept, although formally novel, is obvious to a person skilled in the art.

The applicant therefore claims numerous inventions for which no special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 can be found in dependent Claims 2 - 9 and for which no justified common inventive concept can be found in the application as a whole.

**Box V** (Reasoned statement according to  
PCT Rule 66.2(a)(ii))

**1. Novelty (PCT Article 33(2))**

- 1.1 The present set of claims is formally novel in relation to the prior art, because independent Claim 1 mentions injection into muscle cells or muscle cell complexes of mammals presenting "modified symptoms, which may be pathological, or tumours" as a technical feature.
- 1.2 Claim 10 is not novel. **D7** describes the infection of cell cultures with OAV205 (OAV287 with the *Taenia ovis* 45W antigen), from which recombinant protein for further processing was subsequently obtained (Figure 3).

Apart from this strict interpretation, the production of recombinant proteins from OAV287 vectors in infected cell cultures is present throughout the prior art, for example in **D1** (Figure 2). The

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

additional technical feature of Claim 10, namely the subsequent extraction of the recombinant protein, is so trivial that, even if formal novelty existed, an inventive step would not be acknowledged.

**2. Inventive step (PCT Article 33(3))**

2.1 The present claims, in so far as they relate to the disclosed portion of the application, namely the use of non-human adenoviral vectors of the type OAV287, are not inventive for the following reason:

D2 can be regarded as the closest prior art. D2 teaches that the known drawbacks of the human adenoviruses (hAd), namely the neutralizing humoral immune response due to preexisting antibodies against widespread human adenoviruses, the undesirable endogenous expression of viral genes and the risk of replication of the administered vector as a result of opportunistic infection with a complementary human wild-type virus, can be overcome by the use of a non-human adenovirus. Vectors with an OAV287 basic skeleton, in particular the same hAAAT-expressing vector as in the present application, are used for this purpose. Systemic administration of this vector in mice by injection into the tail vein is mentioned (D2: page 6931, left-hand column, section "In vivo application ..."; page 6931, right-hand column, third paragraph under "Results"). D2 shows that pre-existing humoral immunity against human adenoviruses (hAd) in BALC/c mice can be overcome by

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

the use of the ovine vectors. D2 also teaches that repeated systemic administration of OAV vectors gives rise to problems, because OAV itself induces neutralizing antibodies which, after a first administration, completely block systemic readministration of the same vector (page 6935, left-hand column, lines 40 - 60). In fact, readministration of the same vector does not result in further expression of hAAT in BALB/c mice after 31 days (Figure 3A).

The difference from D2 is that the applicant has administered the ovine adenovector OAVhAAT in C57/BL-6 or BALB/c mice locally by injection into the skeletal muscle. The following technical effects are referred to in the application:

- i) The OAV vector effectively infects the skeletal muscle, in contrast to hAd vectors (page 8, lines 1 - 4), thereby allowing the use of low doses of virus.

The application contains neither comparative data (OAV vs. hAd in muscle tissue) which support this statement nor absolute figures concerning the efficiency of the gene transfer of OAV vectors and a general method that allow direct comparison with the hAd vectors.

- ii) The expression of the transgene is also observed in mice of the C57/BL-6 strain following a second administration of the OAV vector (page 7, lines 1 - 2; Figure 3).

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

This effect is shown in the application **solely** in the mice strain C57/BL-6, which, as is generally known, differs from the BALB/c strain used in D2 as regards the persistence of the transgene expression. The description indicates (page 14, lines 16 - 19; Table 1) that a dose of  $10^9$  infectious OAVhAAT particles had induced an anti-hAAT antibody titre of 100 000 in BALB/c, compared with 10 000 in C57/BL-6, 30 days after injection. Although the application reports the antibody titre in BALB/c only for this vector dose, the conditions for fresh administration of the vector that exist in C57/BL-6 are presumably distinctly more favourable than in BALB/c (because of the low titre of preexisting antibodies), particularly if, for example, one bears in mind that, according to Morral et al., 1997 (cited in the application), the disappearance of hAAT from the serum is correlated with the appearance of antibodies and expression in C57/BL-6 was generally of longer duration than in other mouse strains. It is therefore not admissible to attribute this effect solely to the use of OAV287 and/or intramuscular injection.

- iii) The OAV vector, unlike hAd vectors, does not express viral genes in muscle (page 15, lines 27 - 29).

This effect is not at all as surprising as the applicant makes out, because it was already known from **D1** (Figures 7 and 8) and from document **D10**

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

mentioned therein (page 20, line 22 - page 23, line 20) that OAV287 does not replicate productively in heterologous cell types and the viral genes of the OAV vector are not expressed in many cell lines. This advantageous property, which suggests the use of OAV287 vectors in gene therapy, is also already reflected in the claims of D1 (in particular Claim 4). Furthermore, OAV was selected in **D2** precisely on account of its abortive replication outside sheep cells (page 6930, right-hand column, lines 7 - 12; page 6935, left-hand column, lines 3 - 5). There were therefore already enough hints in the prior art to lead a person skilled in the art to expect this effect in individual tissues in an organism as well.

Apart from the special case of the administration of low OAV287 vector doses in the skeletal muscle of C57/BL-6, effects i) to iii) mentioned by the applicant are either already known or obvious, or are so inadequately supported and disclosed that transfer to the claimed field does not seem plausible at present. Furthermore, no specific therapeutic use was shown, as should usually be the case when a second medical treatment is claimed. Instead, the second medical treatment is claimed in all possible pathologies (hereditary, acquired, malignant).

With the prior art according to D2 as the point of departure, the objective problem to be solved was therefore to obtain an alternative method for administering OAV vectors.

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

Intramuscular injection was the obvious alternative for a person skilled in the art and was, moreover, not even novel in connection with OAV287 vectors, because it was already used in D8. In addition, intramuscular injection of adenoviral vectors was already well known in connection with human adenoviruses; see, for example, D5. The transfer of this practical knowledge from a very closely related field to a similar vector is obvious to a person skilled in the art.

**3. Industrial applicability (PCT Article 33(4))**

The PCT Contracting States have no uniform criteria for assessing the industrial applicability of the subjects of the present Claims 1 - 9. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

**Box VI** (Certain cited documents)

## Certain cited documents (PCT Rule 70.10)

Application No.	Publication date	Filing date	Priority date
Patent No.			(valid claim)
	(day/month/year)	(day/month/year)	(day/month/year)

D6: EP-A-1 001 030      17 May 2000      22 September 1998 -

Document D6, denoted as a P document in the international search report, is prior art within the meaning of EPC Article 54(3) in European proceedings, because its filing date is earlier than the claimed priority date of the present application. This would apply, under EPC Article 54(3), to Contracting States which are mentioned both in D6 and in the present application, namely all.

**Box VII** (Certain defects in the international application)

1. The correct Gene Bank Accession Number for the nucleotide sequence of the OAV isolate 287 is U40839 and not U40389 (description, page 4, line 24).

**Box VIII** (Certain observations on the international application)

The following observations are made pursuant to PCT Articles 5 or 6.

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

1. The application does not comply with the requirements of PCT Articles 5 and 6. The claimed subject matter is neither sufficiently disclosed nor supported by the description and the claims are partly inconsistent with the description. The reasons are as follows:
  - i) Even in the hypothetical case in which the applicant was able to convincingly demonstrate effects i) - iii) associated with the use of OAV287 vectors (see under Inventive step) compared with the human adenovectors (hAd), transfer to the whole of the claimed subject matter would nevertheless not be allowable. Just because hAd and OAV287, both of which are heterologous expression systems for the experimental animal used, namely mouse, might show such different effects in the animal, it is not at all obvious why other non-human adenovectors (which are also heterologous) should behave precisely like OAV287 and not like hAd. In other words, the effects as a whole cannot be demonstrated for non-human adenovectors other than OAV287 and the claimed use of other non-human adenovectors is not disclosed (PCT Article 5).  
  
ii) The technical feature of Claim 1 is the local injection into muscle cells. The description mentions the gene transfer into other target organs or tissues which may occur as a result

.... / ....

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 00/07601

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV, V, VI, VII, VIII

of systemic introduction (page 8, lines 10 - 13). Also, liver-specific promoters are especially mentioned as a preferred embodiment (page 5, lines 12 - 18), which is clearly inconsistent with the claimed subject matter, contrary to PCT Article 6.

2. Claim 1 does not comply with the requirements of PCT Article 6, because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The expression "muscle cell complexes" is unclear. Furthermore, the expression "modified as well as pathological symptoms" is likewise unclear: the unknown nature of these modifications, which presumably may also not be pathological, does not reflect any associated technical features (PCT Preliminary Examination Guidelines Chapter III, paragraph 4.6). It is also unclear whether the subordinate clause "which present modified symptoms, that may be pathological" refers to "mammals" or to "muscle cells or muscle cell complexes".

VERTRAG ÜBE

IE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 28 JAN 2002  
EPO

## INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  20054P WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/EP00/07601	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  04/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  06/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK  C12N15/861		
Anmelder  DEVELOGEN AG für entwicklungsbio....et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 11 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>		

Datum der Einreichung des Antrags  07/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  24.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Brenz Verca, S Tel. Nr. +49 89 2399 7702



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07601

## I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-16 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-10 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

### Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07601

- Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- die Ansprüche eingeschränkt.  
 zusätzliche Gebühren entrichtet.  
 zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
 weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2.  Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- erfüllt ist  
 aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- alle Teile.  
 die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

# **INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07601

## **1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-9 Nein: Ansprüche 10
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-10
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-10 Nein: Ansprüche

## **2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

## **VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)  
und / oder
2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

**siehe Beiblatt**

## **VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
**siehe Beiblatt**

## **VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

Es wird auf die folgenden Dokumente aus dem Internationalen Recherchenbericht verwiesen:

- D1: WO 97 06826 A (BOTH GERALD WAYNE ; COMMW SCIENT IND RES ORG (AU))  
27. Februar 1997 (1997-02-27)
- D2: HOFMANN C. ET AL.: 'Ovine adenovirus vectors overcome preexisting humoral immunity against human adenoviruses in vivo.' JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 73, Nr. 8, 20. Juli 1999 (1999-07-20), Seiten 6930-6936, ISSN: 0022-538X
- D3: US-A-5 820 868 (PREVEC LUDVIK ET AL) 13. Oktober 1998 (1998-10-13)
- D4: FR-A-2 763 959 (TRANSGENE SA) 4. Dezember 1998 (1998-12-04)
- D5: CHEN H.-H. ET AL.: 'DNA FROM BOTH HIGH-CAPACITY AND FIRST-GENERATION ADENOVIRAL VECTORS REMAINS INTACT IN SKELETAL MUSCLE' HUMAN GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 3, Februar 1999 (1999-02), Seiten 365-373, ISSN: 1043-0342
- D6: EP-A-1 001 030 (BOEHRINGER INGELHEIM INT) 17. Mai 2000 (2000-05-17)

Zusätzlich werden noch die folgenden Dokumente herangezogen:

- D7: XU ZZ, HYATT A, BOYLE DB, BOTH GW: 'Construction of ovine adenovirus recombinants by gene insertion or deletion of related terminal region sequences.', VIROLOGY, , -31. Maerz 1997, Band 230, Nr. 1, Seiten 62 - 71
- D8: ROTHLS JS, BOYLE DB, BOTH GW, PYE AD, WATERKEYN JG, WOOD PR, LIGHTOWLERS MW.: 'SEQUENTIAL NUCLEIC ACID AND RECOMBINANT ADENOVIRUS VACCINATION INDUCES HOST-PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES AGAINST TAENIA OVIS INFECTION IN SHEEP', PARASITE IMMUNOLOGY, Mai 1997, Band 19 , Seiten 221 - 227.
- D9: KLONJKOWSKI B, GILARDI-HEBENSTREIT P, HADCHOUEL J, RANDRIANARISON V, BOUTIN S, YEH P, PERRICAUDET M, KREMER EJ.: 'A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo.', HUMAN GENE THERAPY, , -20. November 1997, Band 8, Nr. 17, Seiten 2103 - 2115
- D10: WO 9603508 A, in D1 erwähnt.

**Zu Punkt IV (Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung )**

Die vorliegende Anmeldung ist nicht einheitlich im Sinne von Regel 13.1 PCT. Die Begründung dafür ist folgende:

1. Das einzige gemeinsame Konzept zwischen den unabhängigen Ansprüchen 1 und 10 ist die Verwendung eines nicht-humanen Adenovirusvektors zur Herstellung eines Mittels für den Transfer von genetischem Material. Solche Verwendungen sind aber schon aus **D1, D2, D3, D7, D8 und D9** bekannt, also liegt kein gemeinsames erfinderisches Konzept vor.
2. Ferner ist innerhalb von unabhängigem Anspruch 1 die Verwendung eines nicht-humanen Adenovirusvektors zur Herstellung eines Mittels für den Transfer von genetischem Material durch lokale Injektion das gemeinsame Konzept zwischen den beabsichtigten Anwendungen, nämlich die Injektion in "Muskelzellen von Säugern, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen oder Tumoren". Da die intramuskuläre Verabreichung von OAV287 in Schafen zur Immunisierung aus **D8** bekannt ist, ist dieses Konzept zwar formell neu, aber für den Fachmann naheliegend.

Somit beansprucht der Anmelder eine ganze Fülle von Erfindungen, für die weder in den abhängigen Ansprüchen 2-9 ein besonderes technisches Merkmal im Sinne von Regel 13.2 PCT, noch in der Anmeldung als Ganzes ein begründetes gemeinsames erfinderisches Konzept gefunden werden kann.

**Zu Punkt V (Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii))**

**1. Neuheit (Artikel 33(2) PCT)**

- 1.1 Der vorliegende Satz von Ansprüchen ist gegenüber dem Stand der Technik formell neu, da der unabhängige Anspruch 1 die Injektion in Muskelzellen oder Muskelzellkomplexe von Säugern, die "veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen", oder Tumoren als technisches Merkmal erwähnt.
- 1.2 Anspruch 10 ist nicht neu. **D7** beschreibt die Infektion von Zellkulturen mit OAV205 (OAV287 mit dem *Taenia ovis* 45W Antigen), aus denen anschließend das rekombinante Protein zur Weiterverarbeitung gewonnen wurde (Figur 3).  
Abgesehen von dieser strikten Interpretation, die Produktion rekombinanter Proteine

aus OAV287 Vektoren in infizierten Zellkulturen ist im Stande der Technik allgegenwärtig, z. B. in D1 (Figur 2). Das zusätzliche technische Merkmal des Anspruchs 10, nämlich die anschließende Gewinnung des rekombinanten Proteins, ist dermassen banal, daß selbst bei einer formellen Neuheit eine erfinderische Tätigkeit nicht anerkannt werden würde.

## **2. Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT)**

- 2.1 Die vorliegenden Ansprüchen sind, sofern sie den offenbarten Teil der Anmeldung betreffen, nämlich die Verwendung von nicht-humanen adenoviralen Vektoren des Typs OAV287, nicht erfinderisch aus dem folgenden Grund:

D2 kann als der nächste Stand der Technik angesehen werden. D2 lehrt, daß die bekannten Nachteile der humanen Adenoviren (hAd), nämlich die neutralisierende humorale Immunantwort durch schon vorher dagewesene Antikörper gegen weit verbreitete menschliche Adenoviren, die unerwünschte endogene Expression viraler Gene und die Gefahr der Replikation des verabreichten Vektors durch eine opportunistische Infektion mit komplementierendem menschlichem Wildtypvirus, mittels Verwendung eines nicht-humanen Adenovirus umgangen werden können.

Dabei wurden Vektoren mit OAV287-Grundgerüst verwendet, insbesondere der gleiche hAAT-exprimierende Vektor wie in der vorliegenden Anmeldung. Die systemische Verabreichung dieses Vektors in Mäusen durch Injektion in die Schwanzvene ist erwähnt (D2: S 6931, l. Kolonne, Abschnitt "in vivo application..."; S. 6931, r. Kolonne, 3. Abschnitt unter "results"). D2 zeigt, daß in BALC/c Mäusen eine vorexistierende humorale Immunität gegen humane Adenoviren (hAd) durch die Verwendung der ovinen Vektoren umgangen werden kann. D2 lehrt auch, daß eine mehrfache systemische Verabreichung von OAV Vektoren problematisch ist, da OAV selber neutralisierende Antikörper induziert, die nach einer ersten Verabreichung eine systemische Neugabe desselben Vektors komplett blockiert (S. 6935, l. K., Z. 40-60). Tatsächlich führte eine Neugabe desselben Vektors nach 31 Tage zu keiner Neuexpression von hAAT in BALB/c Mäusen (Figur 3A).

Der Unterschied von D2 besteht darin, daß der Anmelder den ovinen Adenovektor OAVhAAT in C57/BL-6 oder BALB/c Mäusen lokal durch Injektion in den

Skelettmuskel verabreicht hat. Dabei wird in der Anmeldung auf die folgenden technischen Effekte verwiesen:

- i) Der OAV Vektor soll gut den Skelettmuskel infizieren, im Gegensatz zu hAd Vektoren (S.8, Z. 1-4) und somit die Verwendung von niedrigen Virusdosen ermöglichen.

Es liegen in der Anmeldung weder Vergleichdaten (OAV vs. hAd im Muskelgewebe vor), die diese Aussage unterstützen, noch absolute Zahlen über die Effizienz des Gentransfers von OAV Vektoren und eine gemeinsame Methode, die einen direkten Vergleich mit den hAd Vektoren erlauben.

- ii) Die Expression des Transgens wird in Mäusen des Stammes C57/BL-6 auch nach einer zweiten Verabreichung des OAV Vektors beobachtet (S.7, Z. 1-2; Figur 3).

Dieser Effekt wird in der Anmeldung **einzig und alleine** mit dem Mäusestamm C57/BL-6 gezeigt, der sich bekanntlich vom in D2 benutzten BALB/c Stamm in Bezug auf die Persistenz der Transgenexpression unterscheidet. Aus der Beschreibung (S. 14, Z. 16-19; Tabelle 1) ist zu entnehmen, daß eine Dosis von  $10^9$  infektiösen OAVhAAT Partikel 30 Tage nach Injektion einen anti- hAAT Antikörpertiter von 100'000 in BALB/c-induziert hatte, verglichen mit 10'000 in C57/BL-6. Obwohl der Antikörpertiter in BALB/c nur für diese Vektordosis in der Anmeldung angegeben ist, ist anzunehmen, daß in C57/BL- 6 wesentlich günstigere Bedingungen für eine Wiederverabreichung des Vektors vorliegen als in BALB/c (wegen dem niedrigeren Titer an vorexistierenden Antikörpern), insbesondere wenn man z.B. aus Morral et al, 1997 (in der Anmeldung zitiert) im Auge hält, daß das Verschwinden von hAAT aus dem Serum mit dem Auftreten von Antikörper korreliert und die Expression in C57/BL-6 im allgemeinen länger dauerte als in anderen Mäusestämme. Es ist also nicht zulässig, diesen Effekt einzig auf die Verwendung von OAV287 und/oder die intramuskuläre Injektion zu begründen.

- iii) Der OAV Vektor exprimiert keine virale Gene im Muskel, im Gegensatz zu hAd Vektoren (S. 15, Z. 27-29).

Dieser Effekt ist keineswegs so überraschend, wie der Anmelder ihn darstellt, da schon aus **D1** (Figuren 7 und 8) und aus dem darin erwähnten Dokument **D10** (S. 20, Z. 22 - S. 23, Z. 20) bekannt war, daß OAV287 in heterologen Zelltypen nicht produktiv repliziert und die virale Gene des OAV Vektors in vielen Zelllinien stumm sind. Diese vorteilhafte Eigenschaft, die für die Verwendung von OAV287 Vektoren in der Gentherapie spricht ist auch schon in den Ansprüchen von D1 (insbesondere Anspruch 4) widerspiegelt. Ferner wurde OAV in **D2** gerade wegen seiner abortiven Replikation außerhalb von Schafszellen gewählt (S. 6930, r.Kolonne, Z. 7-12; S. 6935, I. Kolonne, Z. 3-5). Es gab also schon genügend Hinweise im Stand der Technik, die dem Fachmann diesen Effekt auch in einzelnen Geweben in einem Organismus erwarten ließen.

Außer dem speziellen Fall der Verabreichung von niedrigen OAV287 Vektordosen in den Skelettmuskel von C57/BL-6 sind also die Effekte i) bis iii), die vom Anmelder erwähnt werden, entweder schon bekannt oder naheliegend, oder so wenig unterstützt und offenbart, daß eine Übertragung auf dem beanspruchten Bereich derzeit nicht glaubhaft erscheint. Ferner wurde keine konkrete therapeutische Verwendung gezeigt, wie das bei Beanspruchung einer zweiten medizinischen Anwendung üblicherweise der Fall sein sollte. Stattdessen wird die zweite medizinische Verwendung bei allen möglichen Pathologien (ererbts, erworben, maligne) beansprucht.

Ausgehend vom nächsten Stand der Technik D2 war also das zu lösende objektive Problem die Beschaffung einer alternativen Verabreichungsweise für OAV Vektoren.

Die intramuskuläre Injektion lag für den Fachmann als Alternative auf der Hand und war übrigens nicht einmal neu im Rahmen von OAV287 Vektoren, da schon in **D8** verwendet. Die intramuskuläre Verabreichung von adenoviralen Vektoren war außerdem schon gut bekannt im Rahmen der humanen Adenoviren, siehe z. B. in **D5**. Die Übertragung dieses praktischen Wissens aus einem eng verwandten Gebiet auf ein analoges Vektor ist für den Fachmann naheliegend.

### **3. Gewerbliche Anwendung (Artikel 33(4) PCT)**

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-9

gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

**Zu Punkt VI (Bestimmte angeführte Unterlagen)**

**Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
D6: EP-A-1 001 030	17. Mai 2000	22. September 1998	

Das im Internationalen Recherchenbericht als P-Dokument bezeichnete Dokument D6 wird in einem möglichen Europäischen Verfahren zum Stand der Technik im Sinne von Artikel 54(3) EPÜ gehören, da sein Anmeldedatum vor dem beanspruchten Prioritätsdatum der vorliegenden Anmeldung liegt. Dies würde nach Artikel 54(4) EPÜ für diejenigen Vertragsstaaten gelten, die sowohl in D6 als auch in der vorliegenden Anmeldung benannt worden sind, nämlich alle.

**Zu Punkt VII (Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung)**

1. Die richtige Genbank Acc. Nr. für die Nukleotidsequenz des OAV-Isolats 287 ist U40839 und nicht U40389 (Beschreibung, Seite 4, Zeile 24).

**Zu Punkt VIII (Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung)**

Die folgenden Bemerkungen werden unter Artikel 5 oder 6 PCT gemacht:

1. Die Anmeldung genügt nicht den Erfordernissen der Artikeln 5 und 6 PCT. Die beanspruchte Materie ist nicht genügend offenbart, nicht durch die Beschreibung unterstützt und die Ansprüche stehen teilweise auch im Widerspruch mit der Beschreibung. Die Gründe sind die folgenden:

- i) Selbst im hypothetischen Falle wo der Anmelder die mit der Verwendung von OAV287-Vektoren assoziierten Effekte i)-iii) (siehe unter erfinderischer Tätigkeit) gegenüber den humanen Adenovektoren (hAd) glaubhaft machen könnte, wäre eine Übertragung auf die Gesamtheit der beanspruchten Materie trotzdem nicht zulässig. Gerade weil hAd und OAV287, die beide heterologe Expressionssysteme für das verwendete Versuchstier Maus darstellen, solch unterschiedliche Effekte im Tier zeigen würden, ist überhaupt nicht ersichtlich, warum andere nicht-humane Adenovektoren (die ebenfalls heterolog sind) sich ausgerechnet wie OAV287 und nicht wie hAd verhalten sollten. Im Klartext: die Effekte können nicht pauschal für andere nicht-humane Adenoviren als OAV287 geltend gemacht werden und die beanspruchte Anwendung anderer nicht-humanen Adenoviren ist nicht offenbar gemäß Artikel 5 PCT.
- ii) Das technische Merkmal des Anspruchs 1 ist die lokale Injektion in Muskelzellen. Die Beschreibung erwähnt den Gentransfer in andere Zielorgane oder -gewebe, der durch systemische Einbringung erfolgen kann (S. 8, Z. 10-13). Auch werden vor allem leberspezifische Promotoren als bevorzugte Ausführung angegeben (S. 5, Z. 12-18), was eindeutig im Widerspruch mit der beanspruchten Materie steht, entgegen Artikel 6 PCT.

2. Der Anspruch 1 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. Der Ausdruck "Muskelzellkomplexe" ist unklar. Ferner ist der Ausdruck "veränderte, auch krankhafte Erscheinungen" ebenfalls unklar: die unbekannte Natur dieser Änderungen, die wohl auch nicht krankhaft sein können, verrät keine damit assoziierten technischen Merkmale. (PCT Richtlinien III-4.6). Unklar ist auch, ob der Nebensatz "die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen" sich auf "Säuger" oder auf "Muskelzellen oder Muskelzellkomplexe" bezieht.

- 3. DEC. 2001

- 17 -

**Patentansprüche**

1. Verwendung eines nicht humanen Adenovirusvektors zur Herstellung eines Mittels für den Transfer von genetischem Material durch lokale Injektion in Muskelzellen oder Muskelzellkomplexe von Säugern, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen, oder in Tumoren, zur Therapie von ererbten, erworbenen oder malignen Erkrankungen, umfassend die Hülle eines nicht humanen Adenovirus und darin verpacktes genetisches Material, das
  - (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und
  - (b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen enthält.
2. Verwendung nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Virus ein Adenovirus aus einer nicht humanen Spezies, ausgewählt aus Säugern und Vögeln, ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Virus ein Adenovirus von Schaf oder Rind ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass das Virus ein ovines oder bovinus Mastadenovirus oder Atadenovirus ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 und 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**

- 18 -

dass das Adenovirus vom Schaf das OAV-Isolat 287 ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Transfer von genetischem Material in humane Zellen.

5

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zum Transfer von genetischem Material in den Skelettmuskel.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

10 dadurch gekennzeichnet,

dass die Muskelzellen ausgewählt sind aus Myozyten/Myotubes/Myofibers, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Kombinationen davon.

15 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,

dadurch gekennzeichnet,

dass eine mehrfache Verabreichung des Vektors erfolgt.

10. Verwendung eines nicht humanen Adenovirusvektors zur Herstellung

20 eines Mittels für den Transfer von genetischem Material für die Produktion und Gewinnung rekombinanter Proteine in Zellkultur umfassend die Hülle eines nicht humanen Adenovirus und darin verpacktes genetisches Material, das

- 25 (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und  
(b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen enthält.

30



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00, C12N 15/26, C07K 14/55, C12N 15/12, C07K 14/745</b>		A2	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/55639</b> (43) Date de publication internationale: 10 décembre 1998 (10.12.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01105 (22) Date de dépôt international: 2 juin 1998 (02.06.98)		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/06757 2 juin 1997 (02.06.97) FR		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). LEROY, Pierre [FR/FR]; 4, rue des Dentelles, F-67000 Strasbourg (FR). MICHOU, Anne-Isabelle [FR/AT]; Baumgasse 25/11, A-1030 Wien (AT).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRAL VECTORS COMPRISING A SPLICING SEQUENCE

(54) Titre: VÈCTEURS ADENOVIRaux RECOMBINANTS COMPRENANT UNE SEQUENCE D'ÉPISSAGE

## (57) Abstract

The invention concerns a recombinant adenoviral vector driving from an adenovirus genome at least by deleting all or part of the E1 region, said adenoviral vector comprising an expression cassette of a gene of interest placed under the control of elements necessary for its expression in a host cell or a host organism, said elements required for its expression including at least a splicing sequence. The invention is characterised in that said splicing sequence is derived from a eukaryotic nuclear gene selected among the ovalbumen genes,  $\alpha$  or  $\beta$ -globine, collagen and factor VIII of mammals or a synthetic splicing sequence. The invention also concerns a host cell and an infectious viral particle comprising such a vector, a method for preparing such a particle and their therapeutic or prophylactic use. The invention further concerns a pharmaceutical composition containing said adenoviral vector, said host cell or said viral particle.

## (57) Abrégé

La présente invention a pour objet un vecteur adénoviral recombinant dérivant du génome d'un adénovirus au moins par délétion de tout ou partie de la région E1, ledit vecteur adénoviral comportant une cassette d'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ou un organisme hôte, lesdits éléments nécessaires à l'expression comprenant au moins une séquence d'épissage, caractérisé en ce que ladite séquence d'épissage dérive d'un gène nucléaire eucaryote sélectionné parmi les gènes ovalbumine,  $\alpha$  ou  $\beta$ -globine, collagène et facteur VIII de mammifères ou d'une séquence d'épissage synthétique. Elle concerne également une cellule hôte et une particule virale infectieuse comprenant un tel vecteur, un procédé de préparation d'une telle particule ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Enfin elle a trait à une composition pharmaceutique renfermant ledit vecteur adénoviral, ladite cellule ou ladite particule virale.

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

26 FEB. 2001

FIRM:  
Patentanwälte

Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Februar 2001 (15.02.2001)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/11066 A1**

PCT

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/861, A61K 48/00 [DE/DE]; Erich-Weinert-Strasse 21, D-10439 Berlin (DE).  
HOFMANN, Christian [DE/DE]; Scherenbergstrasse 25, D-10439 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07601
- (22) Internationales Anmeldedatum: 4. August 2000 (04.08.2000) (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 38 332.4 6. August 1999 (06.08.1999) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): HEPAVEC AG FÜR GENTHERAPIE [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖSER, Peter

**Veröffentlicht:**

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

(54) Title: NON-HUMAN ADENOVIRAL VECTOR FOR GENE TRANSFER, ITS USE AND THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: NICHT-HUMANER ADENOVIRALER VEKTOR FÜR DEN GENTRANSFER, SEINE ANWENDUNG UND SEINE HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to the production of a non-human adenoviral vector for gene transfer into mammal cells. This vector is especially suited for the gene transfer into muscle, in particular, into the skeletal muscle, or into cell types found in the muscle or skeletal muscle. Areas of application include the fields of medicine, biotechnology and genetic engineering. When functional DNA sequences are inserted, the vector is suited for treating modified as well as pathological symptoms in cells or cell complexes, for producing biological materials and for vaccinating.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Herstellung eines nicht humanen adenoviralen Vektors für den Gentransfer in Säugerzellen. Insbesondere eignet sich dieser Vektor für den Gentransfer in den Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel, bzw. in Zelltypen, die im Muskel oder Skelettmuskel vorkommen. Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Biotechnologie und die Gentechnik. Bei Einfügung funktioneller DNA-Sequenzen eignet sich der Vektor zur Behandlung von veränderten, auch krankhaften Erscheinungen in Zellen oder Zellkomplexen, zur Produktion biologischen Materials und zur Vakzinierung.

**WO 01/11066 A1**

**NICHT-HUMANER ADENOVIRALER VEKTOR FÜR DEN GENTRANSFER,  
SEINE ANWENDUNG UND SEINE HERSTELLUNG**

5

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines nicht humanen adenoviralen Vektors für den Gentransfer in Säugerzellen. Insbesondere eignet sich dieser Vektor für den Gentransfer in den Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel, bzw. in Zelltypen, die im Muskel oder Skelettmuskel vorkommen. Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Biotechnologie und die Gentechnik. Bei Einfügung funktioneller DNA-Sequenzen eignet sich der Vektor zur Behandlung von veränderten, auch krankhaften Erscheinungen in Zellen oder Zellkomplexen, zur Produktion biologischen Materials und zur Vakzinierung.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Methoden und Vektoren für den Gentransfer mit dem Ziel einer Gentherapie oder Vakzinierung entwickelt worden (Übersicht bei: Verma, M.I. und Somia, N. (1997). Nature 389, 239-242). Dabei werden vor allem Vektoren, die von Retroviren, Adeno-assoziierten Viren (AAV) oder humanen Adenoviren abgeleitet sind, für einen Gentransfer z.B. mit dem Ziel einer Gentherapie favorisiert. Diese Vektortypen haben ein breites Spektrum effizient infizierbarer Zelltypen und sind daher für den Gentransfer in verschiedene Gewebe geeignet.

25

Die adenoviralen Vektoren der sogenannten ersten Generation wurden über das letzte Jahrzehnt intensiv als Gentransfer-Vektoren erforscht (Übersicht bei: Bramson, J.L. et al. (1995). Curr. Op. Biotech. 6, 590-595). Sie leiteten sich vom humanen Adenovirus des Serotyps 5 ab und sind in der essentiellen E1-Region, oft auch in der nicht-essentiellen E3-Region deletiert, wodurch bis zu 8 KBp Fremd-DNA in das Virusgenom inseriert werden können. Diese Vektoren können auf die E1-Defizienz komplementierenden

- 2 -

Zellen zu hohen Titern produziert werden, lassen sich gut lagern und vermitteln in vitro und in vivo einen effektiven Gentransfer. In vivo kommt es aber zu einem schnellen Verlust der Expression der Transgene sowie zum Verlust des Vektorgenoms. Ferner wurde teilweise massive Gewebe-  
5 Toxizität nach Applikation hoher Vektor-Dosen beobachtet. So führt beispielsweise die Verabreichung von humanen Adenovirusvektoren der ersten Generation in den Skelettmuskel von Mäusen zu einer Leukozyteninfiltration des infizierten Gewebes und zur Aktivierung einer T-Zell-Subklasse (Vilquin et al., Hum. Gene Ther. 6 (1995), 1391-1401; Yang  
10 et al., Hum. Mol. Genet. 5 (1996), 1703-1712). Beides wird zumindest zum Teil durch immunologische Reaktionen auf die im Vektor verbliebenen viralen Gene verursacht. Es wurde daher versucht, vor allem weitere frühe virale Gene auszulagern, eine entscheidende Verbesserung des in vivo-Gentransfers konnte damit aber nicht erreicht werden.

15

Neuerdings entwickelte, vollständig rekombinante humane Adenovirus-Vektoren (Kochanek, S. et al. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93; 5731-5736) zeigten in Tiermodellen einen effektiven Gentransfer bei reduzierter Toxizität und eine verlängerte Transgenexpression (Morral, N. et al. (1998),  
20 Hum. Gen. Ther. 9: 2709-2716). Da aber auch diese Vektoren die normale Hülle des humanen Adenovirus sowie im Vektorgenom die für Replikation und Verpackung notwendigen cis-Elemente - die Inverted Terminal Repeats (ITRs) und das Verpackungssignal - aufweisen, bleiben auch bei diesen Vektoren zwei Limitierungen bestehen, die als die Hauptprobleme humaner  
25 Adenovirus-Vektoren gelten können. Beide liegen im menschlichen Ursprung der verwendeten Adenovirusvektoren und der weiten Verbreitung dieser Viren in der menschlichen Bevölkerung begründet: (1) Die zumeist vorhandene Immunität gegen humane Adenoviren führt zu weitgehender Neutralisierung und Opsonisierung des Vektors. Aktuelle Studien in Tiermodellen haben gezeigt, daß ein effizienter Gentransfer bei Vorhandensein dieser Immunität nur durch Einsatz hoher Vektor-Dosen möglich ist (Nunes, F.A. et al. (1999), Hum. Gen. Ther. 10, 2515-2526),

- 3 -

was jedoch zu starken toxischen Nebenwirkungen, unter anderem auch gravierenden hämatologischen Nebeneffekten führen kann (Cichon, G. et al. (1999), J. Gene Med. 1, 360-371). (2) Zudem besteht die Gefahr einer Koreplikation des rekombinanten Vektors bei einer natürlichen Infektion mit einem Wildtyp-Adenovirus mit nicht einschätzbar Folgen. Derzeit beschriebene humane Adenovirus-Vektoren können daher für eine Anwendung zur Gentherapie beim Menschen nur eingeschränkt in Betracht gezogen werden. Ein Ansatz zur Überwindung des Problems der Immunität gegen humane Adenoviren wurde in neuerer Zeit durch die Entwicklung adenoviraler Vektoren nicht humanen Ursprungs gefunden. Das virale Genom ist bei diesen Vektoren weitgehend unverändert, in der Regel wurden kleinere, für die Virus-Propagierung nicht-essentielle Regionen durch ein Transgen ersetzt (WO 97/06826; Mittal, S.K. et al. (1995), J.Gen. Virol. 76, 93-102; Klonjkowski, B. et al. (1997), Hum. Gen. Ther. 8: 2103-2115; Michou, I. et al. (1999). J. Virol. 72, 1399-1410). Ein effizienter Gentransfer mit nicht humanen adenoviralen Vektoren *in vivo* wurde bisher jedoch noch nicht experimentell gezeigt.

Die sich bei bisher bekannten adenoviralen Vektoren ergebenden Probleme können durch den Einsatz eines nicht humanen adenoviralen Vektors gelöst werden, der DNA-Sequenzen in Zielzellen, insbesondere Säugerzellen, transferieren kann und dort eine vorzugsweise transiente Expression des transduzierten Gens in der Zelle bzw. im Organismus bewirkt. Insbesondere eignet sich der nicht humane adenovirale Vektor für den effizienten Gentransfer *in vivo*, z.B. zur Transduktion von Säugerzelltypen, die im Muskel vorkommen, bzw. in der Skelettmuskulatur. Vorrangiges Einsatzgebiet ist der Transfer von genetischem Material in Zellen, beispielsweise mit den Zielen: Therapie genetisch bedingter und erworbener Erkrankungen, Produktion rekombinanter Proteine sowie Vakzinierung von Tieren und Menschen.

- 4 -

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung eines nichthumanen Adenovirusvektors zur Herstellung eines Mittels für den Transfer von genetischem Material, umfassend die Hülle eines nichthumanen Adenovirus und darin verpacktes genetisches Material, das

- 5       (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und  
         (b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen, enthält.

- 10      Das genetische Material des erfindungsgemäßen Gentransfervektors enthält DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus, d.h. eines Adenovirus, das natürlicherweise in einer nichthumanen Spezies vorkommt, die beispielsweise ausgewählt ist aus Säugern und Vögeln, wie aufgeführt in Russell, W.C. und Benkő, M. (1999), Adenoviruses (Adenoviridae): Animal viruses. In: Granoff, A. und Webster, R.G. (Eds): Encyclopedia of Virology. Academic Press, London, und zwar vor allem Adenoviren aus Affen (SAV, verschiedene Serotypen), Ziegen (caprine, verschiedene Serotypen), Hunden (CAV, verschiedene Serotypen), Schweinen (PAV, verschiedene Serotypen), Rindern (BAV, verschiedene Serotypen, Schafen (OAV1-6 und OAV287) und Hühnern (FAV, verschiedene Serotypen) und EDS-Virus. Vorzugsweise ist das Virus ein Adenovirus vom Schaf oder Rind. Beispiele für geeignete Schafadenoviren sind ovine Mastadenoviren oder ovine Atadenoviren wie etwa das OAV-Isolat 287, dessen Nukleotidsequenz unter der Genbank Acc. No. U40389 angegeben ist. Geeignete Rinder-Adenoviren sind bovine Atadenoviren oder bovine Mastadenoviren. Dabei sind im Komplement-Fixierungsassay negative bovine und ovine Atadenoviren besonders interessant.

- 30      Weiterhin enthält der erfindungsgemäße Gentransfervektor eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen, d.h. eine Expressionskassette für ein oder

- 5 -

mehrere Transgene. Die Expressionskassette für das Transgen kann beispielsweise in eine Klonierungsstelle inseriert werden.

Die Transgen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Expressionskontrollsequenzen, die eine Expression in Säugerzellen, beispielsweise in humanen Zellen, erlauben. Die Expressionskontrollsequenzen können konstitutiv in der gewünschten Zielzelle aktiv oder/und regulierbar sein. Die Expressionskontrollsequenzen können viralen oder zellulären Ursprungs sein oder eine Kombination viraler und zellulärer Elemente umfassen. Beispiele für geeignete Promotoren sind virale Promotoren, z.B. RSV-Promotor, CMV Immediate Early Promotor/Enhancer, SV40-Promotor, oder gewebespezifische, dabei vor allem leberspezifische Promotoren, z.B. der humane Albumin-Promotor (Ponder et al., Hum. Gene Ther. 2 (1991), 41-52), der humane  $\alpha$ -1-Antitrypsin Promotor/Enhancer (Shen et al., DNA 8 (1989), 101-108), der PEPCK-Promotor (Ponder et al., Hum. Gene Ther. 2 (1991), 41-52) oder HBV-abgeleitete Hybrid-Promotoren, z.B. E11mCMV-Promotor (Löser et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377 (1996), 187-193). Weiterhin umfassen die Expressionsregulationssequenzen günstigerweise ein Polyadenylierungssignal, beispielweise das des Rinder-Wachstumshormongens (Goodwin & Rottman, J. Biol. Chem. 267 (1992); 16330-16334), das der frühen Transkriptionseinheit von SV40 (van den Hoff et al., Nucleic Acids Res. 21 (1993), 4987-4988) oder das des Herpes Simplex Thymidin-Kinase-Gens (Schmidt et al., Mol. Cell. Biol. 10, (1990), 4406-4411).

25

Der virale Gentransfervektor kann zum Transfer heterologer Nukleinsäuren in permissive Zellen, Zellverbände, Organe und Organismen, insbesondere zur Gentherapie oder zur Vakzinierung eingesetzt werden. Zum Ziel einer Gentherapie kann die genomische Sequenz oder die cDNA eines Gens verwendet werden, dessen Produkt in dem zu behandelnden Patienten fehlt, in unphysiologischen Mengen auftritt oder/und defekt ist. Man kann auch einen Teil einer genomischen Sequenz einsetzen, die eine Mutation im

- 6 -

Zielgen überspannt und mit dieser homolog rekombiniert werden kann. Zum Ziel einer Tumorgentherapie können verschiedene Gene, die ein verlangsamtes Wachstum oder ein Abtöten der Tumorzellen gegebenenfalls in Kombination mit Pharmaka oder durch Immunstimulation bewirken, eingesetzt werden. Zum Ziel einer Vakzinierung können ein oder mehrere, gegebenenfalls veränderte Gene eines pathogenen Organismus, gegen den eine Immunisierung erreicht werden soll, eingesetzt werden.

Weiterhin kann der erfindungsgemäße Gentransfervektor genetisches Material von anderen Viren enthalten, beispielsweise exprimierte oder regulatorische Sequenzen von Hepatitis B und Hepatitis C Virus (HBV, HCV), sowie von Bakterien und pathogenen Ein- oder Mehrzellern, beispielsweise Plasmodium falciparum.

Bevorzugte konkrete Beispiele für Transgene zum Ziel einer Substitutions-Gentherapie sind Gene für sekretierte Serumfaktoren (z.B. humane Blutgerinnungsfaktoren IX (FIX) und VIII (FVIII), Erythropoietin (Epo)  $\alpha$ -1-Antitrypsin (AAT)), sowie Gene für Proteine, die bei Muskelerkrankungen einsetzbar sein könnten (z.B. Dystrophin, Utrophin), und das bei Morbus Wilson defekte Gen (ATP7B). Zum Ziel einer Tumortherapie sind bevorzugte konkrete Transgene Tumorsuppressorgene wie p16 oder p53 (einzelne oder in Kombination, z.B. P16/p53), Gene für verschiedene Interleukine (einzelne oder in Kombination, z.B. IL2/IL7) sowie Suizid-Gene, z.B. Herpes Simplex Virus Typ I Thymidin-Kinase (HSV-TK).

25

Der Vektor ist geeignet für den Gentransfer in Zellen oder Zellkomplexen, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen, z.B. für die Gentherapie, beispielsweise zur Therapie von ererbten oder malignen Erkrankungen. Der Vektor eignet sich ebenso für die Vakzinierung, z.B. für die Vakzinierung gegen Pathogene, insbesondere Viren, Bakterien sowie eukaryontische Ein- oder Mehrzeller oder für die Vakzinierung gegen maligne oder nichtmaligne Zellen bzw. Zellpopulationen.

- 7 -

Überraschenderweise kann eine effiziente Expression des Transgens selbst nach einer mehrfachen Verabreichung des Vektors erreicht werden. Dies führt zu erheblichen Vorteilen gerade auch für Anwendungen auf dem Gebiet der Gentherapie und der Vakzinierung. Ein weiterer Vorteil ist die - 5 im Vergleich mit humanen Adenovirusvektoren - beobachtete verringerte Expression von vektoreigenen Genen des Vektors nach dem Gentransfer in die Zielzelle, wobei vorzugsweise im wesentlichen überhaupt keine Expression von vektoreigenen Genen nach dem Gentransfer erfolgt. Dies führt zu einer deutlich erhöhten Sicherheit für die Anwendung im 10 Organismus, insbesondere im Menschen.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist der Einsatz des Gentransfervektors zur Gewinnung von Proteinen durch Überexpression in kultivierten Zellen. Aufgrund der sehr effizienten Expression der mittels des Vektors 15 transduzierten Gene in Zellkulturen, z.B. in IMR-90 und humanen leberabgeleiteten Zellen, wird eine innovative Basis zur Produktion von rekombinanten Proteinen im industriellen Maßstab ermöglicht, die mit der bisher hauptsächlich verwendeten Produktion in CHO Zellen konkurrieren kann.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zum Transfer von genetischem Material 20 in eine Zielzelle und vorzugsweise zur Expression dieses genetischen Materials in der Zielzelle und vorzugsweise zur Expression dieses genetischen Materials in der Zielzelle verwendet werden. Die Zielzelle ist bevorzugt eine humane Zelle. Es können jedoch auch nicht humane 25 Zielzellen, insbesondere nicht humane Säugerzellen, beispielsweise für veterinarmedizinische Anwendungen oder Anwendungen in der Forschung, verwendet werden. Der Gentransfer kann *in vitro*, d.h. in kultivierten Zellen, aber auch *in vivo*, d.h. in lebenden Organismen oder spezifischen Geweben 30 oder Organen derartiger Organismen erfolgen.

- 8 -

Besonders bevorzugt wird der erfindungsgemäße Vektor zum Gentransfer in Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel, eingesetzt. Dieser Befund ist umso überraschender, da bisher verwendete humane adenovirale Vektoren den Skelettmuskel nur schlecht infizierten. Die Muskelzellen sind bevorzugt ausgewählt aus Myozyten/Myotubes/Myofibers, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Kombinationen davon.

Die bevorzugte Verabreichungsform des Vektors hängt von der geplanten Anwendung ab. Für muskelgerichteten Gentransfer oder Transfer in einen soliden Tumor ist beispielsweise eine lokale Applikation des Vektors durch intramuskuläre/intratumorale Injektion vorzuziehen. Zum Gentransfer in andere Zielorgane oder -gewebe kann eine systemische Einbringung, beispielsweise durch intraarterielle oder intravenöse Injektion erfolgen. Der gerichtete Transfer in spezielle Gewebe oder Organe kann im letzteren Fall entweder durch einen natürlichen bzw. modifizierten Tropismus des Vektors für bestimmte Zelltypen oder durch Auswahl von Gefäßen, die das zu treffende Gewebe versorgen, erfolgen.

Die Dosierung kann erst nach genaueren Studien zur Effizienz des Gentransfers durch den jeweiligen Vektor entschieden werden. In tierexperimentellen Studien werden typischerweise  $10^7$  bis  $10^{13}$ , z.B.  $10^9$  bis  $10^{11}$  virale Partikel/Kg Körpergewicht eingesetzt. Die genaue Dosierung kann jedoch je nach der Art des Vektors, der Art und Schwere der Erkrankung und der Art der Verabreichung modifiziert werden.

Für den Fall, dass mehrere Dosierungen des Vektors in zeitlichen Abständen verabreicht werden sollen, wird bei den ersten Dosierungen vorzugsweise eine relativ geringe Dosierung des Vektors, z.B.  $10^7$  bis  $10^9$  virale Partikel pro Kilogramm Körpergewicht eingesetzt, um das Entstehen einer Immunantwort gegen den Vektor zu verhindern, durch welche die Verabreichung nachfolgender Dosierungen unwirksam gemacht werden könnte. Überraschenderweise wurde gefunden, dass selbst bei der

- 9 -

Verabreichung geringer Vektordosierungen eine effiziente Transgenexpression gefunden wird.

Die Herstellung nichthumaner Gentransfer-Adenovirus-Vektoren kann durch Insertion von Transgen-Expressionskassetten und gegebenfalls weiterer genetischer Elemente in einen Basisvektor, z. B. einen natürlichen nicht humanen Adenovirus oder eine davon abgeleitete Variante, z. B. eine partiell deletierte Variante und Vermehrung des resultierenden Vektors in geeigneten permissiven Zellen erfolgen.

10

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert werden. Es zeigen:

**Abbildung 1:** Effiziente Expression von humanem  $\alpha_1$ -Antitrypsin (hAAT)

15 nach Injektion von OAVhaat in den Quadriceps-Muskel. Je 5 Tiere aus zwei Mausstämmen (Balb/C und C57/Bl-6) erhielten Injektionen von insgesamt ca.  $1 \times 10^9$  infektiösen Partikeln OAVhaat in einem Volumen von insgesamt 150  $\mu\text{l}$  (75  $\mu\text{l}$  pro Hinterbein). Drei Tage nach Infektion wurde Blut entnommen und die Konzentration von hAAT im Serum mittels ELISA bestimmt. Jede Säule repräsentiert ein individuelles Tier.

**Abbildung 2:** Der Skelettmuskel ist Ort der Infektion durch OAV und Ort der

OAV-vermittelten Genexpression nach intramuskulärer Injektion von OAVhaat in Mäuse. Balb/C-Mäuse wurden mit  $1 \times 10^9$  infektiösen Partikeln

25 OAVhaat (2 und 3) oder mit Puffer (1) wie in Abbildung 1 beschrieben injiziert und drei Tage nach Applikation getötet. DNA und RNA wurden aus dem injizierten Skelettmuskel sowie aus Leber und Milz nach Standardmethoden präpariert. a) Southern Blotting von 20  $\mu\text{g}$  mit EcoRI verdauter DNA aus Skelettmuskel, Leber und Milz. Die Hybridisierung erfolgte gegen eine für OAV spezifische Sonde, die Position des 2399 bp großen EcoRI-Fragmentes aus dem OAV-Vektor ist angezeigt. Mit EcoRI verdauter OAV-DNA, äquivalent zu 5 Kopien pro Zelle, wurde als

- 10 -

Positivkontrolle benutzt. Identische Nummern bezeichnen identische Tiere.

b) RNase-Schutz-Assay mit 20 µg Gesamt-RNA aus Skelettmuskel. Die Hybridisierung erfolgte gegen eine 364 Basen lange Sonde, die das EcoNI-Fragment des humanen aat-Gens überspannt. 20 und 40 pg einer in vitro synthetisierten haat-mRNA wurden als Positivkontrolle benutzt; die Position der für das haat-Transkript spezifischen Bande wird durch den Pfeil angezeigt.

**Abbildung 3:** Dosis-Wirkungs-Beziehung von OAV-abhängiger Expression

und Möglichkeit der intramuskulären Readministration von OAV-Vektoren in Mäusen. C57/Bl-6-Mäuse erhielten in einer intramuskulären Injektion die angegebenen Mengen infektiöser Partikel von OAVhaat ( $10^9$  bis  $3 \times 10^7$ ). Die Expression des haat-Gens wurde durch Messung der Konzentration von  $\alpha_1$ -Antitrypsin im Serum der Mäuse drei Tage nach Infektion mittels ELISA bestimmt (dunkle Säulen). Die zweite Injektion erfolgte am Tag 35 nach der ersten Applikation des Vektors, alle Tiere erhielten eine Dosis von  $5 \times 10^8$  infektiösen Partikeln. Die Bestimmung von Serum-hAAT erfolgte drei Tage nach der zweiten Vektorgabe (hellgraue Säulen).

**Beispiele:**

### 1. Material und Methoden

#### *1.1 Zellen und Viren*

HEK-293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen ATCC CRL-1573), permissiv für E1-deletierte humane Adenoviren) wurden in DMEM (Gibco BRL) supplementiert mit 2 mM Glutamin und 10% foetalem Kälberserum bei 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. CSL 503 Zellen (foetale ovine Lungenzellen, permissiv für OAV, Pye et al, Austr. Vet. J. 66 (1998), 231 - 232) wurden unter den gleichen Bedingungen, aber in 15 % foetalem Kälberserum kultiviert.

Als viraler Vektor wurde OAVhAAT verwendet, der die humane  $\alpha_1$ -Antitrypsin (hAAT) cDNA unter transkriptioneller Kontrolle der Rous

- 11 -

Sarcoma-Virus 3'LTR enthält (Hofmann et al., J. Virol 73 (1999), 6930 - 6936). Als Kontrolle wurde Ad5haat verwendet, ein E1-deletierter humaner Ad5 Adenovirusvektor, welcher die identische haat-Expressionskassette wie OAVhaat enthält. Die Viren wurden in permissiven Zelllinien kultiviert und wie zuvor beschrieben aufgereinigt (Sandig et al., Gene Therapy 3 (1996), 1002 - 1009). Virustiter wurden durch einen Endpunkt-Verdünnungs-Assay mit permissiven Zelllinien bestimmt. Typische Titer für OAV- und Ad5-Vektoren waren  $0,5 - 1 \times 10^{10}$  bzw.  $0,5 - 1 \times 10^{11}$  infektiöse Partikel pro ml. Das Verhältnis von Partikeln zu infektiösen Partikeln für rekombinante Ad5- und OAV-Vektoren war 40:1.

### ***1.2 Versuchstiere***

Acht Wochen alte weibliche Balb/C und C57/Bl-6 Mäuse wurden von Charles River, Deutschland, bezogen. Den Mäusern wurden intramuskuläre Injektionen in den Quadricepsmuskel mit einem Maximalvolumen von  $35 \mu\text{l}$  pro Injektion verabreicht. Das Blut wurde aus der äußeren Schwanzvene gewonnen, um den Serum  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Spiegel zu bestimmen. Die Bestimmung von hAAT erfolgte durch ELISA wie bei Cichon und Strauss (Gene Therapy 5 (1998) 85 - 90) beschrieben.

Der Titer von neutralisierenden Antikörpern gegen virale Vektoren wurde aufgrund der Fähigkeit von Serum zur Hemmung der Infektion von 293 Zellen durch humane Ad-Vektoren und von CSL503 Zellen durch OAV-Vektoren wie bei Hoffmann et al. (1999), supra, beschrieben bestimmt. Der Antikörpertiter gegen hAAT in Serum wurde nach dem Verfahren von Morral et al. (Hum Gene Ther 8 (1997), 1275 - 1286) bestimmt.

### ***1.3 Analyse von DNA und RNA***

DNA und Gesamt-RNA aus Mausgeweben und kultivierten Zellen wurde unter Verwendung von Standardmethoden isoliert. Southern Blots zum

- 12 -

Nachweis OAV-spezifischer DNA in Mausorganen wurde wie zuvor beschrieben (Hoffmann et al. (1999), supra) unter Verwendung von 20 µg genetischer DNA durchgeführt. RNase-Protektionstests wurden mit 20 µg Gesamt-RNA aus Skelettmuskel unter Verwendung von Standardprozeduren 5 durchgeführt. Ein radiomarkiertes 362 bp RNA-Fragment umfassend das EcoN1-Fragment von humaner hAAT cDNA wurde als Sonde verwendet.

RT-PCR wurde mit 2 µg Gesamt-RNA aus Skelettmuskel unter Verwendung des Titan™ Kits (Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland) nach den 10 Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Hochexpression von Serumproteinen nach Injektion eines von OAV 15 abgeleiteten Vektors in den Skelettmuskel von Mäusen

Injektion von ca. 10<sup>9</sup> infektiösen Partikeln des Vektors OAVhaat in den M. quadriceps von Balb/C-bzw. C57/Bl-6-Mäusen erbrachte Konzentrationen 20 des Transgens (hAAT) im Mausserum, die zwischen 2,6 und 5,9 µg/ml (Balb/C) und 9,8 und 20,0 µg/ml (C57/Bl-6) lagen.

Um nachzuweisen, dass der Muskel tatsächlich der Ort sowohl der Infektion durch den Vektor als auch der Expression der hAAT-cDNA ist, wurden die Präsenz für den Vektor spezifischer DNA mittels Southern Blotting 25 (Abbildung 2a) und für das hAAT-Transkript spezifischer RNA mittels RNase-Protektions-Assay (Abbildung 2b) durchgeführt. Wie aus Abbildung 2a ersichtlich ist, war für OAV spezifische DNA zwar im Skelettmuskel nachweisbar, nicht aber in Leber und Milz, den Organen, die bei Ausschwemmung des Vektors in den Kreislauf primäres Ziel einer Infektion 30 wären. Es ist daher davon auszugehen, dass kein größerer Anteil des verabreichten Vektors nach intramuskulärer Injektion in das System gelangt ist. Abbildung 2b zeigt deutlich, dass im Skelettmuskel hohe

- 13 -

Konzentrationen für das Transgenprodukt hAAT spezifischer RNA nachzuweisen sind, was den Skelettmuskel als Ort der hAAT-Genexpression nach intramuskulärer Vektorgabe ausweist.

5 Die hohe Effizienz des muskelspezifischen Gentransfers mit OAV-abgeleiteten Vektoren wird aus Abbildung 3 erkennbar. Die Injektion abnehmender Dosen von OAVhAAT in den Skelettmuskel ( $10^9$  bis  $3 \times 10^7$  infektiöse Partikel pro Injektion) ergab zwar abnehmende hAAT-Konzentrationen im Serum der entsprechenden Mäuse, jedoch wurde mit  
10 der geringsten Dosis ( $3 \times 10^7$  infektiöse Partikel) noch immer eine hAAT-Konzentration von mehr als 100 ng/ml erreicht. Dies ist eine Konzentration, die über den für die meisten therapeutischen Serumproteine (z.B. Koagulationsfaktoren) notwendigen therapeutischen Konzentrationen liegt.  
15 Bei geringen verabreichten Dosen war darüber hinaus eine wiederholte intramuskuläre Injektion desselben Vektors möglich, die bei einer zweiten Verabreichung von  $5 \times 10^8$  infektiösen Partikeln 35 Tage nach der ersten Verabreichung moderate Serumkonzentrationen an hAAT ergaben (250 -  
20 2300 ng/ml, dunkle Balken in Abbildung 3). Die Ursache für diese Phänomene liegt offensichtlich in der Induktion einer nur geringfügigen Immunantwort gegen den Vektor, insbesondere bei Nutzung einer kleinen Vektordosis.

2.2 *Induktion einer humoralen Immunantwort gegen das Transgenprodukt nach Injektion eines von OAV-abgeleiteten Vektors in den Skelettmuskel von Mäusen*

25 Für die Nutzung eines Vektors für die Vakzinierung ist die effiziente Expression des Transgens und die Präsentation der durch das Transgen kodierten Antigene erforderlich. Die Effizienz der Vakzinierung spiegelt sich im Antikörpertiter gegen das Transgen/Antigen wider. Das Potential von OAV als Vakzinierungsvektor wurde durch ein einfaches Experiment bestimmt.

- 14 -

Balb/C-Mäuse erhielten eine intramuskuläre Injektion von  $5 \times 10^8$  infektiösen Partikeln OAVhAAT. Am Tag 30 nach Infektion wurden die Antikörpertiter gegen das Transgenprodukt, humanes  $\alpha_1$ -Antitrypsin, im Serum der Mäuse folgendermaßen bestimmt: 96-Well Platten wurden mit 5  $100 \mu\text{l}$  eines gegen hAAT gerichteten Antikörpers (DiaSorin, Stillwater, USA, Kat.-Nr. 80852) für 1 h bei 37°C beschichtet, über Nacht mit Blockpuffer (5% Magermilchpulver in TBS, 0.05% Tween 20) bei 4°C und anschließend mit einem hAAT-Standard (100 ng/ml in 100  $\mu\text{l}$ ) für 2 h bei 37°C inkubiert. Auf die Platte wurden dann Verdünnungen der 10 entsprechenden Mausseren (1:10 bis 1:100000, in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$ ) gegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  eines gegen Maus-IgG gerichteten, Peroxidase-gekoppelten 15 Antikörpers aus Kaninchen (Pierce, Rockford, USA) zugegeben, und die Inkubation wurde für 2 h fortgesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach Standardmethoden unter Nutzung von OPD als Substrat, die Messung der Absorption wurde bei 595 nm durchgeführt. Im Serum aller untersuchten Mäusen des Stammes Balb/C ( $n=5$ ) war der Antikörpertiter 20 gegen hAAT nach einer Injektion von ca.  $10^9$  infektiösen Partikeln größer als 100000. Im Serum von Mäusen des Stammes C57/Bl-6 ( $n=5$ ) lag der Antikörpertiter, entsprechend der verabreichten Dosis des Vektors OAVhaat, zwischen 100000 und 10 (siehe Tabelle 1). Die Induktion von 25 gegen hAAT gerichteten Antikörpern in letzgenanntem Mausstamm ist bemerkenswert, da dieser Stamm nach Infektion mit humanen adenoviralen Vektoren, die das hAAT-Gen transduzieren, keine Antikörper gegen das Transgenprodukt bildeten (Michou et al., Gene Therapy 4 (1997), 473 - 482; Morral et al., (1997) supra).

- 15 -

**Tabelle 1.** Antikörpertiter gegen hAAT im Serum von Mäusen (C57/Bl-6), die eine intramuskuläre Injektion der angegebenen Dosis von OAVhaat erhielten.

Verabreichte Dosis	Antikörpertiter gegen hAAT
$1 \times 10^9$	1:10.000
$5 \times 10^8$	1:10.000 - 1:1.000
$2,5 \times 10^8$	1:1000
$1,2 \times 10^8$	1:100-1:10
$6 \times 10^7$	1:100
$3 \times 10^7$	1:100

10

### 2.3 Keine nachweisbare Expression von OAV-Genen nach Infektion.

Um nachzuweisen, ob die Injektion von OAV im Skelettmuskel von Mäusen zur Expression von frühen oder späten OAV-Genen führt, wurde 20 und 40 15 h nach Infektion Gesamt-RNA aus dem Skelettmuskel gewonnen und auf OAV-spezifische Transkripte durch RT-PCR analysiert. In Kontrolltieren wurde eine Infektion mit dem humanen Adenovirus Ad5haat ( $10^{10}$  infektiöse Partikel) und ein entsprechender Transkriptnachweis durchgeführt.

20 In mit OAVhaat infizierten Maus-Skelettmuskelzellen konnten weder frühe OAV-Gene (E4-Gen, DNA-Bindungsprotein-Gen) noch späte OAV-Gene (Hexon-Gen und pVII-Gen) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten in mit Ad5haat infizierten Skelettmuskelzellen PCR-Produkte des E4orf6 Gens (20 und 40 h nach Infektion) und des DNA-Bindungsprotein- 25 Gens (20 h nach Infektion) nachgewiesen werden.

Während somit virale Gene des Ad5-Vektors im Maus-Skelettmuskel exprimiert werden, konnte eine Expression von viralen Genen des OAV nicht nachgewiesen werden.

- 16 -

2.4 *Effiziente Expression von mittels eines nicht humanen Adenovirusvektors transduzierten Genen im Zellkultursystem*

IMR 90-Zellen (Nichols et al., Science 196 (1977), 60-63) wurden mit  
5 OAVhaat bei einer MOI von 1 infiziert. Nach 3 Tagen wurde die Expression von rekombinantem hAAT durch einen ELISA quantitativ bestimmt. Die Menge des rekombinanten Proteins wurde mit 1 mg/ml Zellkulturüberstand/ $10^6$  Zellen bestimmt.

**Patentansprüche**

1. Verwendung eines nicht humanen Adenovirusvektors zur Herstellung  
5 eines Mittels für den Transfer von genetischem Material, umfassend  
die Hülle eines nicht humanen Adenovirus und darin verpacktes  
genetisches Material, das

- (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und
- (b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht  
10 humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide  
kodieren, in operativer Verknüpfung mit  
Expressionskontrollsequenzen enthält.

2. Verwendung nach Anspruch 1,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
dass das Virus ein Adenovirus aus einer nicht humanen Spezies,  
ausgewählt aus Säugern und Vögeln, ist.

3. Verwendung nach Anspruch 2,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
dass das Virus ein Adenovirus von Schaf oder Rind ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 dass das Virus ein ovines oder bovines Mastadenovirus oder  
Atadenovirus ist.

5. Verwendung nach Anspruch 3 und 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
30 dass das Adenovirus vom Schaf das OAV-Isolat 287 ist.

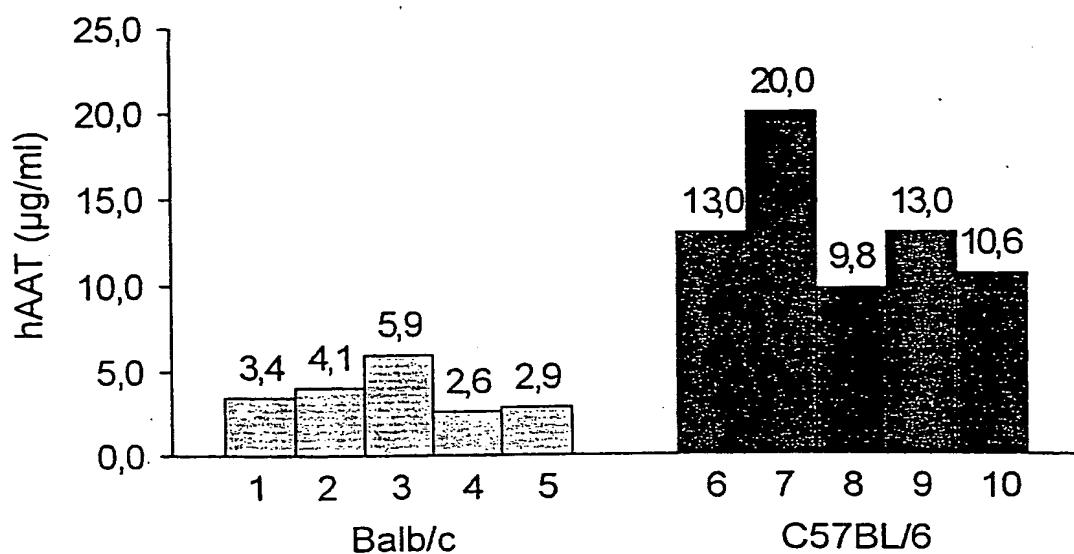
- 18 -

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für den Gentransfer in Zellen oder Zellkomplexe, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen.
- 5 7. Verwendung nach Anspruch 6 zur Therapie von ererbten, erworbenen oder malignen Erkrankungen.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die DNA-Vakzinierung.
- 10 9. Verwendung nach Anspruch 8 für die Vakzinierung gegen Pathogene, insbesondere Viren, Bakterien sowie eukaryontische Ein- oder Mehrzeller.
- 15 10. Verwendung nach Anspruch 8 für die Vakzinierung gegen maligne oder nichtmaligne Zellen bzw. Zellpopulationen.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Produktion rekombinanter Proteine.
- 20 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zum Transfer von genetischem Material in Säugerzellen.
13. Verwendung nach Anspruch 12 zum Transfer von genetischem Material in humane Zellen.
- 25 14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13 zum Transfer von genetischem Material in den Muskel, insbesondere in den Skelettmuskel.
- 30 15. Verwendung nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,

- 19 -

dass die Muskelzellen ausgewählt sind aus Myozyten/Myotubes/Myofibers, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Kombinationen davon.

- 5        16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15,  
              dadurch gekennzeichnet,  
              daß der Gentransfer durch Injektion erfolgt.
- 10      17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,  
              dadurch gekennzeichnet,  
              dass eine mehrfache Verabreichung des Vektors erfolgt.

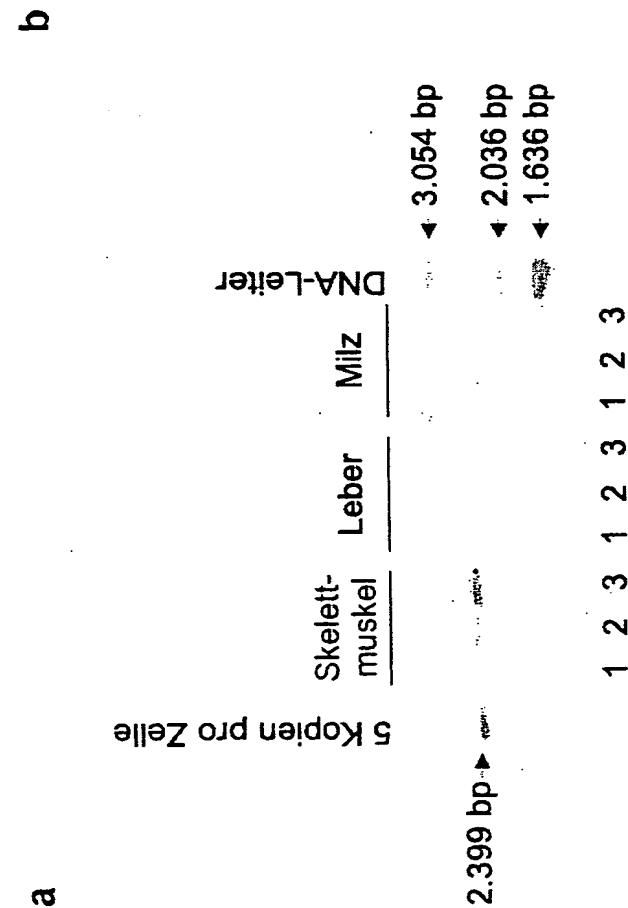
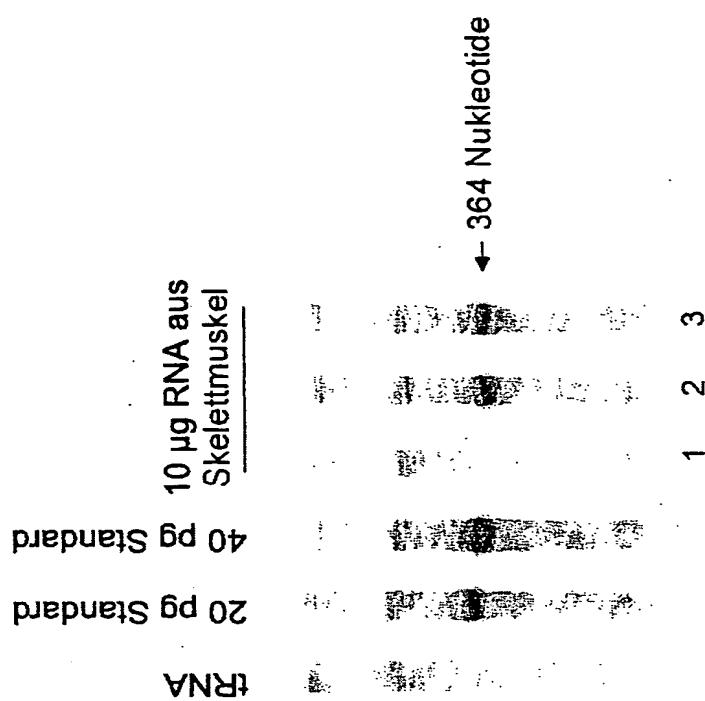


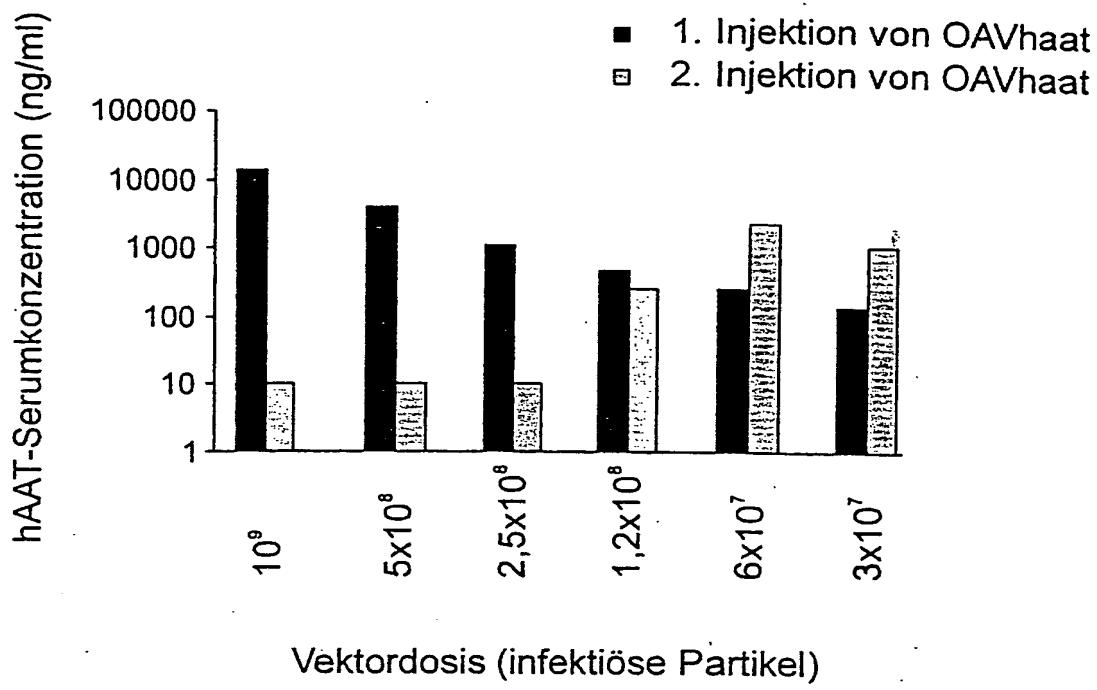
10/049301

WO 01/11066

PCT/EP00/07601

2/3





Patent claims

1. The use of a non-human adenoviral vector for producing a means for the transfer of genetic material, comprising the coat of a non-human adenovirus and genetic material which is packaged therein and which comprises
  - (a) DNA sequences of a non-human adenovirus and
  - (b) one or more DNA sequences which code for peptides or polypeptides which are heterologous in relation to the non-human adenovirus, in operative linkage to expression control sequences.
2. The use as claimed in claim 1,  
**characterized in that**  
the virus is an adenovirus from a non-human species selected from mammals and birds.
3. The use as claimed in claim 2,  
**characterized in that**  
the virus is an ovine or bovine adenovirus.
4. The use as claimed in claim 3,  
**characterized in that**  
the virus is an ovine or bovine mastadenovirus or atadenovirus.
5. The use as claimed in claim 3 and 4,  
**characterized in that**  
the ovine adenovirus is the OAV isolate 287.
6. The use as claimed in any of claims 1 to 5 for gene transfer into cells or cell complexes which display altered, also pathological manifestations.
7. The use as claimed in claim 6 for the therapy of congenital, acquired or malignant disorders.

8. The use as claimed in any of claims 1 to 5 for DNA vaccination.

5 9. The use as claimed in claim 8 for vaccination against pathogens, in particular viruses, bacteria and eukaryotic unicellular or multicellular organisms.

10 10. The use as claimed in claim 8 for vaccination against malignant or nonmalignant cells or cell populations.

15 11. The use as claimed in any of claims 1 to 5 for producing recombinant proteins.

12. The use as claimed in any of claims 1 to 11 for transferring genetic material into mammalian cells.

20 13. The use as claimed in claim 12 for transferring genetic material into human cells.

14. The use as claimed in claim 12 or 13 for transferring genetic material into muscle, in  
25 particular into skeletal muscle.

15. The use as claimed in claim 14,  
**characterized in that**  
the muscle cells are selected from  
30 myocytes/myotubes/myofibers, fibroblasts,  
dendritic cells, endothelial cells and  
combinations thereof.

16. The use as claimed in any of claims 1 to 15,  
35 **characterized in that**  
gene transfer takes place by injection.

17. The use as claimed in any of claims 1 to 16,  
**characterized in that**

- 19 -

the vector is administered more than once.

### Patentansprüche

1. Verwendung eines nicht humanen Adenovirusvektors zur Herstellung eines Mittels für den Transfer von genetischem Material durch lokale Injektion in Muskelzellen oder Muskelzellkomplexe von Säugern, die veränderte, auch krankhafte Erscheinungen aufweisen, oder in Tumoren, zur Therapie von ererbten, erworbenen oder malignen Erkrankungen, umfassend die Hülle eines nicht humanen Adenovirus und darin verpacktes genetisches Material, das
  - (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und
  - (b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen enthält.
2. Verwendung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass das Virus ein Adenovirus aus einer nicht humanen Spezies,  
ausgewählt aus Säugern und Vögeln, ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass das Virus ein Adenovirus von Schaf oder Rind ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass das Virus ein ovines oder bovinus Mastadenovirus oder Atadenovirus ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 und 4,  
dadurch gekennzeichnet,

dass das Adenovirus vom Schaf das OAV-Isolat 287 ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Transfer von genetischem Material in humane Zellen.

5

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zum Transfer von genetischem Material in den Skelettmuskel.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

10 dadurch gekennzeichnet,

dass die Muskelzellen ausgewählt sind aus Myozyten/Myotubes/Myofibers, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Kombinationen davon.

- 15 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,

dadurch gekennzeichnet,

dass eine mehrfache Verabreichung des Vektors erfolgt.

10. Verwendung eines nicht humanen Adenovirusvektors zur Herstellung

20 eines Mittels für den Transfer von genetischem Material für die Produktion und Gewinnung rekombinanter Proteine in Zellkultur umfassend die Hülle eines nicht humanen Adenovirus und darin verpacktes genetisches Material, das

- (a) DNA-Sequenzen von einem nicht humanen Adenovirus und  
25 (b) eine oder mehrere DNA-Sequenzen, die für bezüglich des nicht humanen Adenovirus heterologe Peptide oder Polypeptide kodieren, in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen enthält.